

A pályázat vezetését 2004-ben, a témavezető, Dr. Kevei Ferenc hirtelen halála után vettem át. Az elmúlt két és fél év során az általa megkezdett munka folytatását tűztük ki célul, ugyanakkor két új élesztőgomba mitokondriális genom szerveződésének vizsgálatát kezdtük el.

Pályázatunk egy korábbi, 2001-ben záródó, a gombák extrakromoszómális elemeinek diverzitásával foglalkozó tematikus OTKA pályázat néhány eredményére támaszkodott. Munkánk során az extrakromoszómális elemek közül a mitokondriális DNS polimorfikus jellegeinek molekuláris szintű elemzését folytattuk több gomba csoport esetében. A fekete *Aspergillus*-okkal kapcsolatban célunk volt a már korábban részlegesen elemzett *A. niger* 1a és az *A. tubingensis* 2b mtDNS típusok teljes mitokondriális genom szekvenálása, valamint a teljes genomok ismeretében az *A. niger* 1a → *A. tubingensis* 2b mitokondrium átvitelből származó mitokondriálisan rekombináns utódok eltéréseinek molekuláris szintű elemzése.

Két alaptörzsünk, az *A. niger* 1a és az *A. tubingensis* 2b mtDNS típusok teljes mitokondriális genom szekvenálása során első lépésként elkészítettük, illetve pontosítottuk az *A. niger* 1a és *A. tubingensis* 2b mtDNS típusú törzsek fizikai és funkcionális térképét. A gének pontos helyét és sorrendjét Southern-hibridizációval, valamint a PCR segítségével határoztuk meg. Elvégeztük a teljes genomok klónozását és a klónok illetve PCR termékek szekvenálásával meghatároztuk a teljes mitokondriális genomok szekvenciáját. A géntartalom és a génsorrend mindkét esetben megegyezett. A mtDNS mérete az *A. niger* 1a esetében 31103 bp, míg az *A. tubingensis* esetében 33656 bp. A teljes mitokondriális genomok szekvenciáját az NCBI adatbankjában deponáltuk (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>).

A két törzs fizikai térképe közti számos eltérést legtöbb esetben véletlenszerű nukleotid eltérések okozták, amíg a mintegy 2,5 kb méretbeli eltérés három gén (*cox1*, *atp9* és *nad4L*) területére volt lokalizálható. A méretbeli különbségek nagy részéért a *cox1* gén introntartalma felelős. Az *A. niger* 1a mtDNS típusú törzsének *cox1* génje 2728 bp, és csak egyetlen 1015 bp-os intront tartalmaz. Az *A. tubingensis* 2b mtDNS típusú törzsének *cox1* génje 5058 bp méretűnek bizonyult, három intront tartalmaz, amelyek sorrendben 1148 bp, 1126 bp, és 1085 bp hosszúságúak. Mindegyik intron I-es típusú mitokondriális intron, LAGLIDADG típusú endonukleázszerű fehérjét kódolnak. Az *A. tubingensis* 2. intronja azonos az *A. niger* 1a típusú mtDNS *cox1* génjének egyetlen intronjával, inszerciós helyük is megegyezik. Az *A. tubingensis* 2b *cox1* génjének 1. intronja az *A. nidulans* *cox1* 2. intronjával homológ, míg a 3. intronja nem mutat homológiát egyik ismert mitokondriális intronnal sem. További kisebb méretbeli eltérés az *atp9* és *nad4L* génekben adódott. Az *A. niger* 1a típus esetében az *atp9* gén intronmentes, és 225 bp hosszúságú. Az *A. tubingensis* 2b esetében a gén egy 329 bp-os

ORF nélküli intront tartalmaz, így a gén hossza 554 bp. A 270 bp-os *nad4L* gén *A. tübingensis* 2b esetében intronmentes, míg *A. niger* 1a esetében egy 477 bp hosszúságú intront tartalmaz, mely I-es típusú mitokondriális intron. Hasonlóan az *A. tübingensis* 2b típus *atp9* gén intronjához ez sem hordoz ORF-et. Az intron egy része homológiát mutat *Neurospora crassa* és *Podospira anserina nad4L* génjének intronjával. Az intronok jelenléte e két génben a szakirodalom szerint nem túl gyakori jelenség, közeli rokon fajok esetében nem hordoznak intront ezek a gének. További kisebb méretbeli eltéréseket okoznak az intergénikus régiók eltérései, de ezek esetenként nem nagyobbak néhány tíz bázispárnál. A restriktációs hely polimorfizmust pedig az esetek nagy részében nukleotid eltérések okozzák, illetve az intronokban jelenlevő hasítóhelyek felelősek az eltérésekért. Négy *A. niger* 1a és kilenc *A. tübingensis* 2b típusra specifikus restriktációs hely található genomokban, melyeket elsősorban pontmutációk okoznak. A két törzs közötti nukleotid eltérések azonban nemcsak hasítóhelybeli eltéréseket felelősek, jó példa erre az *atp6* gén egyik pontmutációja, amely az N909 esetében az oligomycin rezisztenciát okozza. Az N400-as oligomycin szenzitív *A. niger* törzsben (melyből szelektálták az oligomycin rezisztens N909-et) az *atp6*-os gén 517. nukleotidja citozin. A rezisztens változatban pedig ugyanebben a pozícióban timin nukleotid található. Ez a mutáció, illetve a vele járó aminosav változás a felelős az oligomycin rezisztenciáért. Az oligomycin érzékeny *A. tübingensis* 2b ilyen tekintetben az N400-ra hasonlít, ott is citozin található az 517. pozícióban.

A genomok esetében számos egyedi szekvenciát detektáltunk, melyek mindkét törzsünkben jelen vannak, de rokon fajokra nem jellemzőek. A *nad1* és *nad4* gének közti mintegy 3000 bp-os szakaszon két nyitott leolvasási keret található (*orf1* és *orf2*). E két gén mindkét törzsben nagyfokú homológiát mutat egymással. Az *orf1* feltételezett fehérjeje 44%-os szekvencia homológiát mutat a *Saccharomyces cerevisiae* mitokondriális Endo.SceI endonukleázzal. A második ORF 52%-os homológiát mutat *Staphylococcus aureus* helyspecifikus rekombinázával. Tehát mindkét fehérje leginkább az I.-típusú intronokban kódolt endonukleázokhoz hasonlít. Pontos funkciójuk nem ismert, de valószínűleg az intronok kivágódásában, vagy a genomok rekombinációban lehet szerepük. Mindkét törzsben az *orf2* és a *nad4* gén között egy ismétlődő szakaszokból álló régiót találtunk. Először háromszor ismétlődik egy 29 bp-os szekvenciárész mindkét törzsben, igaz a második elemben egy pontmutáció található az *A. tübingensis* 2b esetében, ami egy extra *EcoRI* hasítóhelyet eredményez. Szintén ebben a törzsben a második 39 bp-os elem is háromszor ismétlődik, míg *A. niger* 1a esetében csak egy 48 bp-os szekvenciárész fordul elő, mely azonosságot mutat a 39 bp-os *A. tübingensis*-beli szekvenciával. Mindkét törzsben a *cob* és *nad1* gének közti

intergénikus területen találtunk egy 223 nukleotidnyi szakaszt, ami ellentétes leolvasási irányban helyezkedik el. 95%-os homológiát mutat *A. niger* NRRL 322-es törzs genomi PX21 promóterével. Semmilyen egyéb szekvenciával nem mutat még alacsony fokú homológiát sem. Az egyik legérdekesebb szekvenciárészlet a *nad1* gén részleges duplikációja: *nad2* gén után 66 nukleotid távolságra egy 68 bp-os szakasz található, amely szinte 100%-os homológiát mutat a *nad1* gén 87.-154. bp-os szakaszával. Ez a DNS szakasz mindkét törzsben megtalálható ugyanebben a pozícióban. Sem az előtte sem az utána lévő szakasz nem mutat semmiféle homológiát a *nad1* génnel. Jelenléte a genomban valószínűleg összefügghet a szinte közvetlen utána következő 315 bp-os DNS szakasszal (*orf3*), mely 96%-os homológiát mutat egy feltételezett endomukleázzal. Fehérje szinten 59%-os homológiát mutat *Podospora anserina nad3* intron fehérjével illetve annak egy részletével. Ezek a genomban jelenlevő szekvenciák (*orf1-3*, ismétlődő régió, parciális gén darabok) arra utalnak, hogy korábban valamilyen rekombinációs események zajlottak le a törzsekben, és ezekre utaló, a géneknek ma már működésképtelen változatait találtuk meg a genomban. Megállapíthatjuk tehát, hogy a két mitokondriális genom nagymértékben hasonló, és elsősorban a törzsek különböző introntartalma felelős a mtDNS-ek közti eltérésekért.

A két mitokondriális genom egymásra hatásának vizsgálatához protoplasztfúziós technika segítségével mitokondrium átvitelt hajtottunk végre törzseink közt. A donorként a mitokondriálisan oligomycin rezisztens *A. niger* 1a típust alkalmaztuk, míg a recipiens az *A. tübingensis* 2b mtDNS típusú törzs volt. A fúzió után a recipiens sejtmagjára, és a donor rezisztens mitokondriumára szelektáltunk. Negyven regenerált utód átvizsgálásával hatféle rekombináns típust azonosítottunk, melyek előfordulási gyakorisága is eltért: B205: 37,5%, B212: 35%, B240: 10%, B203: 7,5%, B202: 5%, B227: 2,5%. A maradék 2,5%-ot a B201 jelű törzs képviseli, mely a recipiens magja mellett a donor változatlan mitokondriumát örökölte. Elkészítettük az 1a→2b átvitelből származó hat különböző RFLP mintázatú mtDNS-t hordozó izolátum négy enzimes fizikai térképét, és meghatároztuk az egyes típusokat képviselő egy-egy törzs genomméretét: a B205 rekombinánsé 32,73 kb, a B212-é 33,04 kb, a B227-é 32,98 kb, a B202-é 32,92 kb, a B240-é 32,54 kb, míg a B203 rekombinánsé 32,60 kb. A törzsek minden esetben a donor mitokondriumát örökölték, mely a recipiens intronális szekvenciái által módosult. A 2b típusra jellemző mindhárom intron jelen volt az összes rekombináns törzsben, ami egybevág a szakirodalmi adatokkal (az intronok „homingja” szinte 100%-os esemény). Az intronok mozgása azonban beindított egy rekombinációs mechanizmust, amely kiterjedése a különböző típusú rekombináns törzsekben eltérő méretű volt. A *cox1* génbeli eltéréseken kívül nyolc régiót azonosítottunk a fizikai

térképek alapján, melyek jelenléte illetve hiánya eltért az utódokban. A B205 esetében az összes marker 1a-hoz, míg B240 esetében mind a nyolc marker 2b-hez hasonlított, vagyis ez mutatja a legnagyobb eltérést a donor mitokondriumához képest. Ez utóbbi esetben majdnem 14 kb-os részt érintett a *cox1* gén mozgása által beindított rekombináció. Az eltérésekért felelős régiókat PCR technika segítségével felszaporítottuk, és megszekvenáltuk. A kapott szekvencia eredmények alátámasztották a restrikciós markerek elhelyezkedése alapján felállított hipotézisünket. Megállapíthatjuk tehát, hogy a rekombináns utódok kialakulásáért alapvetően a *cox1* gén mobilis intronjai a felelősek.

Annak megállapítására, hogy az intronok mozgásának milyen szerepe van a környezetből izolálható fekete *Aspergillus*-okra elvégeztük számos *A. tübingensis* izolátum mtDNS polimorfizmus vizsgálatát. Az *A. tübingensis* faj mtDNS RFLP mintázatuk alapján hat csoportba osztható (2a-2f). A részletes mitokondriális genom vizsgálatokhoz minden mtDNS RFLP mintázatú típusból egy-egy törzset választottunk ki, és vettünk részletes analízis alá. A 2b törzs részletes térképe előző kísérleteinkből már a rendelkezésünkre állt, és ezt összehasonlítási alapul használtuk fel a többi eltérő mtDNS mintázattal rendelkező törzs térképezése során. A további öt mtDNS RFLP típusról elkészített fizikai térképek alapján a 2a, 2b, 2c, 2d, 2e és 2f törzsek mtDNS méretei 32,3; 33,1; 30,5; 32,1; 33,1 és 32,7 kb-nak bizonyultak. A hat *A. tübingensis* mtDNS típus génsorrendje azonos, a gének és intergénikus régiók nagysága a legtöbb esetben megegyezik. Az előzőekben már ismertetett 2b típushoz képest a 2a, 2c, 2d és 2f típusokban a *cox1* gén mérete különbségeket mutatott, amely az intronok számának eltérésére utal. Az eltérésért felelős részeket megszekvenáltuk és megállapítottuk, hogy a 2b típusra jellemző 1. intron csak a 2b, 2e és 2f típusoknál van jelen, a 2a, 2c és 2d típusokból hiányzik. A 2b típusra jellemző 2. intron a 2c kivételével minden típusban előfordul. A 2b típusra jellemző 3. intron szintén egy kivétellel (2f) minden típusban jelen van. Elmondhatjuk tehát, hogy a variábilis RFLP mintázatok ellenére a hat eltérő típusú *A. tübingensis* mtDNS restrikciós és funkcionális térképek nagyon hasonlóak. Elsősorban introntartalombeli eltérés és néhány specifikus hasítási hely felelős a variábilis RFLP mintázat kialakulásáért. A 2c típusú mtDNS a legkisebb, és a 2f mutatja a legnagyobb eltérést a többi típustól. A 2b és 2e áll a legközelebbi kapcsolatban, mtDNS-ük felépítése szinte teljesen azonos, csak egy *HaeIII* hasítóhelyben térnek el egymástól (*cob* gén előtti régióban egy C→T pontmutáció felelős a restrikciós mintázatbeli eltérésért).

A továbbiakban a szintén a fekete *Aspergillus*-ok közé tartozó *A. japonicus* faj mtDNS polimorfizmusát vizsgáltuk. Az *A. japonicus* faj mtDNS RFLP alapján nyolc csoportra osztható. Korábbi kísérletek során a mtDNS átvitelt a nyolc különböző RFLP mintázatú

csoport között protoplasztfúzióval valósítottuk meg. Jelen munkánk során protoplasztfúzióval létrehozott utódok mtDNS analízisét is végeztük el, különös tekintettel arra a fúziós csoportra, ahol az utódok között fenotípus beli eltéréseket tapasztaltunk. A fúziót követően oligomycin rezisztens regenerált utódok mtDNS RFLP mintázatát összehasonlítva azt tapasztaltuk, hogy rekombináns mtDNS profillal jellemezhető törzsek mellett nagy gyakorisággal szubsztitúciós utódok is izolálhatók. A mitokondrium helyettesítés az *A. niger* fajaggregátum izolátumai közötti mitokondrium transzmisszió során igen ritka, 1% alatti gyakoriságú eseménynek számított. Az *A. japonicus* 1→2, 1→6 és 1→8 mtDNS RFLP osztályok közötti mitokondrium átvitel utódainak 100%-a szubsztitúciós volt, az 1→4 mtDNS típusok közötti transzmisszió utódainak 100%-a valódi rekombinánsnak bizonyult. Az 1→3 és az 1→5 mtDNS RFLP csoportok közötti mitokondrium transzfer utódainak kisebb hányada rekombináns volt, nagyobb hányada azonban helyettesített donor RFLP-jű mitokondrium hordozónak bizonyult. Ez utóbbi két csoport részletes vizsgálatakor kiderült, hogy az mtDNS RFLP mintázata és az utódok fenotípusának eltérése közt összefüggés van, és ezek változása együtt járt a mtDNS átszerveződésével is. Alapvetően három fenotípust azonosítottunk: a regenerált utódok jelentős részére visszafogott konídiumképzése miatt világos telepszínt mutatott. Más utódok erőteljes konídiumképzést - a recipiensre jellemző fekete színben - mutattak, ezeket „feketéknek” neveztük el. Volt egy harmadik csoport, mely még mindig csökkent konídiumképzést mutatott, de a világosnál erőteljesebb volt; ezt a típust átmeneti formának neveztük el. A fúzió után először csak a „világosak” izolálhatók. Bizonyos esetben ezek szegregációra voltak hajlamosak, amely során világos fenotípus egyre jobban kezdett hasonlítani a vad fenotípus morfológiai sajátosságaihoz (világosból képződtek átmeneti formára és a feketékre jellemző szektorok, de az átmeneti forma is képes volt átalakulni feketévé. Ez utóbbi típus nem alakult tovább, ezért végformának tekinthető). A fenotípus összefüggésben volt az mtDNS RFLP mintázatával is. Minden világos szubsztitúciós mtDNS-sel rendelkezett. Az átmeneti formákra többféle rekombináns RFLP volt jellemző, míg a végforma szintén rekombináns volt, de csak egyféle RFLP mintázattal jellemezhető. A változások nyomon követésének érdekében elkészítettük a szülői törzsek és a rekombináns utódok fizikai és részleges funkcionális térképét, és bizonyos részek szekvenciaszintű elemzését. Az utódok a donor mitokondriumát örökölték elsődlegesen, és a szubsztitúciós utódokban ez nem is változik tovább. Számos restriktációs enzimmel emésztettük az izolált mtDNS-eket, és azt tapasztaltuk, hogy a szubsztitúciós utódok RFLP mintázata teljesen megegyezik a donor mtDNS RFLP mintázatával, vagyis az utódok ténylegesen a donor változatlan mitokondriumát örökölték. Az átmeneti formák mtDNS szerveződés vizsgálata azt az

eredményt adta, hogy a mitokondriális genom fokozatosan átalakul, és „recipiensszerűvé” válik: az mtDNS rövidülése (intronvesztés) és bizonyos gének sorrendjének változása volt megfigyelhető. A végleges forma mtDNS-s mind méretében, mind felépítésében nagymértékben eltért a donor mtDNS felépítésétől, és szinte teljesen megegyezett a recipiens törzs mitokondriális genomjával. Intergénikus részek szekvencia analízisével azonban bebizonyítottuk, hogy a végformára jellemző mtDNS is a donorból alakult ki. Megállapíthatjuk tehát, hogy minden utód típus a donor mitokondriumát örökölte elsődlegesen, amely fokozatosan alakult át intronvesztéssel a recipiensre jellemző mtDNS típusúvá. Feltételezésünk szerint ennek oka az, hogy a recipiens magja nem kompatibilis a donor jóval nagyobb mitokondriumával, és intronkivágódási problémák miatt fellépő mitokondriális funkcióhiány okozza a gyengébb növekedést és konídium képzést. Elméletünk alapja az volt, hogy a rekombináns típusok mitokondriuma egyre jobban a recipiensére kezdett hasonlítani, az eltérés a *cob*, de elsősorban a *cox1* gént érintette: jelentős méretbeli csökkenést tapasztaltunk, ami intronok elvesztésére utal (ez a szakirodalom által igen ritka eseménynek számít, jelen esetben pedig jelentős számban fordult elő). Eredményeink nem igazolták ezt az elméletet: totál RNS izolálás, és cDNS készítés segítségével azonban megállapítottuk, hogy mindkét génről képződik működőképes mRNS, így ezek nem felelősek a csökkent konídium képzésért. Megállapíthatjuk tehát, hogy az *A. japonicus* izolátumaink esetében az általunk feltárt mtDNS átrendeződések mellett valamilyen, általunk nem ismert faktorok felelősek fenotípusbeli eltérésekért.

Elkezdtek az *A. japonicus* és *A. carbonarius* törzsek sejtmagi és mitokondriális markerezését. Korábbi kísérletek során az inkompatibilitás miatt csak protoplasztfúzióval tudtunk mitokondrium átvitelt végrehajtani. Célul tűztük ki az azonos mtDNS csoportba tartozó, de eltérő markerekkel rendelkező törzsek létrehozását, melyek segítségével heterokarion képzéssel is elvégezhető a mitokondrium átvitel (az eljárás hasonló a korábban elvégzett *A. tūbingensis* sejtmagháttérű mitokondrium rekombináltatáshoz). Ezen kívül korábbi kísérletek során a mitokondrium átvitel mindig egyirányú volt, mivel csak egy-egy megfelelően markerezett törzzsel rendelkezünk. Célunk volt a fordított irányú mtDNS átvitel elvégzése, illetve annak megállapítása, hogy a szelekciómentes körülmények közt létrejönnek-e rekombináns utódok, és ha igen, akkor ezek összevetése a protoplaszt fúzió során kapott rekombináns utódokkal. Munkánk során azonban nem sikerült megfelelő markerekkel ellátott törzseket létrehozni. Az *A. tūbingensis* esetében viszont korábban elvégeztünk szelekciómentes körülmények közötti mtDNS átvitelt, és számos oligomycin rezisztens és oligomycin érzékeny rekombináns utódot kaptunk. Az így létrehozott

rekombináns utódok mtDNS RFLP vizsgálata során megállapítottuk, hogy a rekombináns típusok nagymértékben megegyeznek a protoplasztfúzióval létrehozott rekombináns utódokkal. Vagyis a szelekciós körülmények nem befolyásolták a rekombináns karakter kialakulását. A rekombinánsok kialakulásáért maga a mitokondriális genom, illetve annak mobilis intronjai felelősek. Feltételezhetően hasonló eredményeket kaptunk volna *A. japonicus* és *A. carbonarius* törzsek keresztezésekor szelekciómentes és oligomycinre szelektált körülmények között is.

*Fusarium*-fajokkal végzett biodiverzitás vizsgálatainkat a mind növénykórtani, mind mikotoxinok szempontjából igen jelentős *F. proliferatum* sensu stricto, *F. verticillioides* (*F. moniliforme*), illetve a *F. subglutinans* sensu stricto izolátumok elemzésével végeztük.

A *F. proliferatum* számos haszonnövény (kukorica, búza, rizs, cirok, spárga, datolyapálma) kórokozója lehet. Vizsgálatainkba összesen 204 izolátumot vontunk be, 120-at kukoricáról, 30-at spárgáról, 31-et pálmákról, 23-at pedig dísznádról. Összesen 16 haplotípust azonosítottunk. A leggyakoribb I-es haplotípus és a hozzá igen hasonló II-es, III-as, illetve IV-es dominált a kukoricán, de többi gazdanövényen is előfordultak, bár szignifikánsan kisebb arányban. Igen nagy számban találtunk azonban olyan haplotípusokat, amelyek csak egyféle gazdanövényről kerültek elő annak ellenére, hogy a gyűjtési területek több helyen is átfedtek. Eredményeinkből arra következtettünk, hogy a *F. proliferatum* faj evolúciójában is jelentős szerepe van a gazda-gomba koevolúciónak. Az eredmények közvetlen gyakorlati haszna az is, hogy a könnyen feltárható mitokondriális mintázat segítségével pontosan azonosíthatjuk az adott fajt. Ennek az alkalmazására már adódott is példa, mikor morfológiai adatok és mtDNS RFLP mintázat alapján azonosítottunk 3 *F. proliferatum* izolátumot, amelyet a martonvásári Mezőgazdasági Kutatóintézetben patogenitási tesztekhez használnak.

A 204 *F. proliferatum* izolátum vizsgálata során találtunk 7 olyan, pálmákról származó tenyészetet, amelyek mtDNS RFLP mintázatában egy hasonló, körülbelül 10 kb méretű fragmentumot. Mivel ezek a mintázatok egyébként magukban foglaltak egy teljes, más izolátumoknál is tapasztalt mitokondriális mintázatot, felmerült a gyanú, hogy önálló mitokondriális genetikai elemet, plazmidot találtunk. Egy korábbi vizsgálat adatait elemezve azt találtuk, hogy összefüggés lehet a plazmid jelenléte, és az izolátumok toxintermelése között. Például, az összes XII-es haplotípusba tartozó izolátum termelt fumonizin B1-et és moniliformint, addig a „plazmidos” tenyészet (szintén XII-es haplotípus) nem termelt kimutatható mennyiségű fumonizin B1-et, és moniliforminból is egy nagyságrenddel kevesebbet tudtak kimutatni. Egy új, egyszerűsített eljárással izoláltuk ennek a tenyészetnek a mitokondriális DNS-ét, ennek gradiens centrifugálással történt tisztítása pedig,

várakozásainknak megfelelően, két sávot eredményezett. A kisebb sűrűségű sáv valóban egyetlen, hozzátévelegesen 10 kb méretű fragmentumot tartalmazott. Így igazolódott, hogy a mintázatban megfigyelt sáv valóban egy önálló mitokondriális plazmid, melyet pFP1-nek neveztük el. Proteináz és exonukleáz hasítások azt mutatták, hogy a plazmid 5' végeit kovalens kötésekkel kapcsolódott terminális fehérjék védik. A teljes szekvencia meghatározásával kiderült, hogy a plazmid DNS 10 336 nt-ből áll. A plazmidot két 400 bp hosszúságú, fordítottan ismétlődő szakasz szegélyezi (terminal inverted repeat; TIR). Két fő, az ellentétes szálakon elhelyezkedő, de nem átfedő nyitott olvasási keretet (open reading frame; ORF) azonosítottunk. Az egyik egy fág-típusú RNS polimerázt (ORF1), a másik pedig egy B-típusú DNS polimerázt (ORF2) kódol. Alacsony mértékű szekvenciabeli hasonlóságok arra engedtek következtetni, hogy a terminális fehérjéket az ORF2 5' végén található szakaszok kódolják. Egy kisebb ORF-et is azonosítottunk, amely ugyancsak kismértékű egyezések alapján, de hasonlóan mutatkozott a fehér korhadást okozó *Pleurotus oestreatus* gombából izolált pMLP1 plazmid mORF1 szakaszához. A hasonlóságot az is erősíti, hogy a pFP1-ben talált kisebb ORF által kódolt fehérje is erősen bázikus ( $pI = 9,25$ ), s valószínű, hogy egy TIR-kötő fehérjét kódol. A kisebb ORF együtt íródik át az ORF1-el.

A pFP1 azonosítására tervezett indítoszekvenciák segítségével a további hat *F. proliferatum* izolátumban is kimutattuk a plazmid jelenlétét. Valós idejű PCR vizsgálatokkal megállapítottuk, hogy a plazmid 0,6-3,4 kópiában van jelen a mitokondriális genomhoz viszonyítva. A továbbiakban etidium-bromid kezeléssel próbáltuk kiirtani a plazmidot az ITEM 2337-es és ITEM 2343-as törzsekből. A kezelés után kapott 250 túlélő telep szűrése során azonban nem találtunk teljesen plazmidmentes tenyészetet. Ráadásul a valós idejű PCR vizsgálatok azt mutatták, hogy szignifikáns kópiaszám-csökkenés mindössze az ITEM 2343-as tenyészetből származó három túlélő törzsben következett be. Ezekben az izolátumokban vizsgáltuk a fumonizin B1 toxin termelését is, de abban a „szülő” törzsektől nem tapasztaltunk szignifikáns eltérést. Így az általános tapasztalatoknak megfelelően a plazmidtartalommal kapcsolatos fenotípus-eltérést nem tudtunk kimutatni.

*F. verticillioides* 174 izolátum *HaeIII* restrictiósz enzimmel kapott mitokondriális RFLP mintázata alapján 6 haplotípust különítettünk el. A banánról származó izolátumok (18) elkülönültek a főleg kukoricáról és még néhány más gazdáról (*Triticum sp.*, *Hordeum vulgare*, *Cucumis melo*) származóktól, és két egymással csaknem megegyező, csak a banánról izolált mintákban azonosított 5-ös és 6-os haplotípusokba tartoztak. A többi 156 izolátumból 144 az 1-es haplotípusba tartozott, és további 12 az 1-es típushoz igen hasonló 2-4-es haplotípusokat képviselték. Elképzelhető, hogy a banánról származó izolátumok önálló



filogenetikai vonalat (filogenetikai fajt) képviselnek a *F. verticilliioides* fajon belül. Ennek eldöntésére azonban további vizsgálatok szükségesek.

Legkiterjedtebb biodiverzitási vizsgálatainkat 210 *F. subglutinans* sensu stricto izolátummal végeztük. Fajon belül a legújabb kutatások két filogenetikai vonalat mutattak ki. Mitokondriális DNS RFLP vizsgálatok is két haplotípust mutattak ki. Hiszton H3 és  $\beta$ -tubulin magi szekvenciák RFLP vizsgálata azt mutatta, hogy a két haplotípus megfelel a korábban leírt két filogenetikai vonalnak. Európában először mutattuk ki ezeket a vonalakat, magi gének rekombinációját egyetlen minta esetében sem találtuk. További vizsgálatok során kiderült, hogy a két csoport tagjai eltérő toxintermelést mutatnak, az egyes csoport tagjai többnyire beauvericin termelők, míg a 2-es csoportba tartozó izolátumok egyáltalán nem termelik ezt a toxint. Vizsgálataink tehát megerősítették a két filogenetikai csoport létezését a fajon belül, sőt önálló fenotípussal is jellemezni tudtuk a morfológiailag egyébként elkülöníthetetlen csoportokat.

Míg magi gének rekombinációját soha nem tapasztaltuk a vizsgált 210 *subglutinans* sensu stricto izolátum esetén, a mitokondrium és a sejtmag rekombinációját, feltételezhetően, 3 esetben is tapasztaltuk. Három afrikai izolátum esetén az 1-es csoportba tartozó sejtmag és a kettes csoportba tartozó mitokondrium együtt fordult elő. Magon belül rekombinációt nem tudtunk kimutatni, minden vizsgált gén (elongációs faktor, hiszton H3,  $\beta$ -tubulin, kalmodulin) az egyes csoportra volt jellemző, sőt mindhárom faj termelt beauvericint is. A 3 enzimmel egyaránt vizsgált mitokondriális RFLP mintázat viszont a kettes csoportra jellemző mintázatokat mutatta. Ha szekvenciaadatok is megerősítik tapasztalatainkat, akkor elsőként a természetben végbemenő mitokondriumátvitel lehetőségét igazoljuk fonalas gombáknál.

Az olykor halálos kimenetelű megbetegedést okozó bazidiomikota élesztőgomba, a *Cryptococcus neoformans* két varietas-ába tartozó törzs mtDNS-ének összehasonlító elemzését végeztük. A kísérletek eredményeként megállapítottuk, hogy a két törzs mtDNS-ének mérete jelentősen eltér egymástól: a *C. neoformans* var. *neoformans* mérete 32,6 kb, míg a *C. neoformans* var. *grubii* mérete 24,1 kb. A mitokondriumon kódolt gének lokalizációja során megállapítottuk, hogy a gének sorrendjében nincs eltérés. A *C. neoformans* mitokondriális genomja viszonylag kicsi méretű és kompakt, rövid intergénikus szakaszok jellemzik, amelyeken nincsenek rekombinogén szekvenciák. Ez magyarázhatja az azonos gén sorrendet, amely egyben az ősi genom szerveződésre is utal. A méretbeli eltérést két olyan régióhoz tudtuk kötni a DNS-en, ahol különböző számú és méretű intronok helyezkednek el: 5 intront találtunk a var. *neoformans* COX1 génjében, míg a var. *grubii* ezen génje intront nem tartalmaz; 2 intront van a var. *neoformans* törzs COB génjében, míg ugyanezen gén a

var. *grubii*-ban 1 intront tartalmaz; intront találtunk a var. *neoformans* törzs LrRNA génjében, míg a var. *grubii* LrRNS génje intron-mentes. Méretbeli és szekvencia szintű eltéréseket megfigyeltünk az intergénikus régiókban is. További munkánkban nyolc, a magi DNS szekvenciák alapján különböző molekuláris genotípus csoportot képviselő törzsön a mtDNS polimorfizmusát figyeltük meg. Az elemzéshez a korábban említett két törzs eltéréseket mutató DNS területeire írt primerek felhasználásával, PCR fingerprint elemzést végeztünk. E törzsek jelentős heterogenitást mutattak, amelyeknek részletes elemzése folyamatban van.

A lombhullató fák kora tavaszi fanedvein élő élesztőközösség három uralkodó faja a *Nadsonia fulvescens* var. *elongata*, a *Xantophyllomyces dendrorhous* és a *Trichosporon pullulans*. Mindhárom faj extrakromoszómális genetikai elemeinek vizsgálata már évek óta folyamatban van Tanszékünkön. Jelen pályázat keretei közt célunk volt a *N. fulvescens* és a *T. pullulans* mtDNS-ének jellemzése.

Restrikciós hasítási képek alapján meghatároztuk a mtDNS méretét, ami a *T. pullulans* esetében 18,1 kb-nak bizonyult. Ezt összehasonlítva az eddig ismert teljes élesztőgomba mitokondriális genomokkal megállapítottuk, hogy a *T. pullulans* mtDNS-e egyike a legkisebbeknek, a Basidiomycota fajok közül pedig ténylegesen az ismert legkisebb. Elkészítettük a törzs fizikai térképét *Bam*HI és *Hind*III enzimekkel. Majd a *Bam*HI-*Hind*III emésztett mtDNS-t pBluescript SK vektorba klónoztuk, és elkezdtük a fragmentumok szekvenciájának meghatározását. Ezidáig 8575 bp szekvenciáját ismerjük, sikeresen azonosítottuk *nad1*, *nad2*, *nad3*, *nad6*, *cox1*, *ATPáz* 9 valamint a (L)rRNS-t kódoló géneket. A szekvencia-adatok érdekessége, hogy a legkisebb mtDNS-sel rendelkező fajok (*Schizosaccharomyces pombe*, *Torulopsis glabrata*) a NADH dehidrogenáz egyetlen alegységének génjét sem tartalmazzák, míg esetünkben ezek közül már négyet megtaláltunk.

A *N. fulvescens* mitokondriális genomja nagy mértékű szekvenciahomológiát mutat a *Saccharomyces cerevisiae*-vel, emellett méretük eltérő, míg a *S. cerevisiae* esetében a 80 kb-t is elérheti a genom nagysága a *N. fulvescens* esetében ez mintegy 40 kb-ra tehető. A *S. cerevisiae* és a vele közel rokon fajok egyedi csoportot alkotnak a gombák körében, ugyanis nem kódolják a NADH dehidrogenáz egyetlen alegységét sem, ugyanakkor a mitokondriális riboszómák felépítésében szerepet játszó egyik fehérje génje (*VAR1*) megtalálható rajtuk. A *N. fulvescens* esetében sem tudtuk azonosítani a genomon a NADH dehidrogenáz egyetlen alegységének génjét sem, ami arra utalhat, hogy bár a két faj meglehetősen eltérő élőhelyhez adaptálódott, evolúciósan közeli rokonságban vannak egymással.

A fent leírt eredményekből négy publikáció már megjelent. Egy további van közlésre elfogadva, illetve egy kéziratunk van közlésre benyújtva a FEMS Microbiological Letters c. folyóirathoz:

**Juhász Á., Pfeiffer I., Vágvölgyi Cs. and Hamari Zs.**

**Comparative analysis of the complete mitochondrial genome organisation of *Aspergillus niger* mtDNA type 1a and *Aspergillus tubingensis* mtDNA type 2b**

A Fusarium fajok és az élesztőgombák esetében néhány kísérlet befejezése a közel jövőben várható. Az adatok összerendezése után még további publikációk elkészítését tervezzük az elkövetkező két éven belül. Ennek értelmében kérem a Tisztelt OTKA Bizottságtól annak lehetőségét, hogy zárójelentésem minősítés-módosítását a későbbiek során kérvényezhessem!